

Untersuchungen zur Lymphozytotoxizität bei
akuter und chronischer Hepatitis

von

Werner Gutmann

aus

Weißenburg / Bayern

1977 # 324



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548225_0036

Aus der Abteilung für klinische Immunologie
des Universitätskrankenhauses Erlangen-Nürnberg
Vorstand: Professor Dr. med. F. Scheiffarth

Untersuchungen zur Lymphozytotoxizität bei akuter und chronischer Hepatitis

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
dem Fachbereich Medizin
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg



vorgelegt
von
Werner Gutmann
aus
Weißenburg / Bayern

Gedruckt mit Erlaubnis des Fachbereichs Medizin
Universität Erlangen-Nürnberg



Dekan: Prof. Dr. E. Rügheimer

Referent: Prof. Dr. F. Scheiffarth

Tag der mündlichen Prüfung: 4. August 1977

I n h a l t s v e r z e i c h n i s

	Seite
Einleitung	1
Patientengut	2
Material und Methodik	3
Statistik	7
Ergebnisse	7
Diskussion	11
Zusammenfassung	16
Anhang	17
Literaturverzeichnis	31

EINLEITUNG.

Die zellvermittelte Immunität besitzt für die Entwicklung der chronischen Hepatitis (6,24) nach heutiger Vorstellung große Bedeutung. In den letzten Jahren wurden jedoch nur wenige einschlägige Untersuchungen veröffentlicht, die diese Vorstellung unterstützen. Die zellvermittelte Immunreaktion gegen HB-Antigen oder Leber-Antigen scheint bei Patienten mit chronisch aktiver Hepatitis stärker zu sein als bei Patienten mit chronisch persistierender Hepatitis wie Lymphozytentransformationsteste oder Leukozytenmigrationsinhibitionsteste zeigen (5, 7, 10, 12, 14, 15, 18, 19, 21, 22, 24, 26). Die Lymphozytotoxizität gegenüber Targetzellen wurde von einigen Autoren sowohl bei experimentellen als auch bei klinischen Lebererkrankungen untersucht (16, 25); sie scheint vermehrt zu sein im Vergleich zu der bei gesunden Kontrollpersonen. Die größte Schwierigkeit bei diesen Experimenten ist die Präparation geeigneter Targetzellen, da die Leberzellen von erwachsenen Spendern nicht in fortlaufenden Zellkulturen gehalten werden können. Deshalb konnte die Spezifität der Lymphozytotoxizität auch bislang nicht klar bewiesen werden.

In der vorliegenden Untersuchung über die Lymphozytotoxizität bei akuten und chronischen Lebererkrankungen verwendeten wir Chang-Zellen und Leber-Zellen, die von einem sechs Monate alten Embryo stammten, als Target-Zellen. Lymphozyten aus dem peripheren Blut wurden als Effektorzellen verwendet. Die Lymphozytotoxizität bei Patienten mit chronisch aktiver bzw. chronisch persistierender Hepatitis und Hepatitis B wird verglichen mit der Lymphozytotoxizität bei Patienten mit rheumatoider Arthritis als einer weiteren chronisch entzündlichen Erkrankung und bei gesunden Kontrollpersonen. In zusätzlichen Experimenten soll die Lymphozytotoxizität in Anwesenheit von autologem Serum oder HB-Antigen gemessen werden, um auch den Einfluß dieser Faktoren auf die Lymphozytotoxizität zu prüfen.

PATIENTEN

In der Studie wurden untersucht: 14 Patienten mit chronisch aktiver Hepatitis, 8 Patienten mit chronisch persistierender Hepatitis, 11 Patienten mit akuter Hepatitis B, 12 Patienten mit rheumatoider Arthritis und 30 gesunde Kontrollpersonen.

Die Diagnose der Lebererkrankungen wurde durch Leberbiopsie bei allen Fällen der chronisch aktiven und chronisch persistierenden Hepatitis gesichert. Sowohl die Laborergebnisse von HB_s-Antigen, SGPT, Serum-IgG-Spiegeln, antinukleären Antikörpern, Rheumafaktoren als auch der Mittelwert und die Standardabweichung der T- und B-Zellen zur Zeit der Untersuchung auf Lymphozytotoxizität sind in Tabelle 2 und 3 aufgezeichnet. Die Patienten wurden zum Zeitpunkt der Blutentnahme weder mit Steroiden noch mit immunsuppressiven Medikamenten behandelt.

MATERIAL UND METHODIK

Als Targetzellen wurden im Mikrozytotoxizitätstest verwendet:

1. Chang-Zellen von Flow Lab., Irvine, Schottland
2. Allogene Leberzellen

Bei diesen Targetzellen handelt es sich um primär angezüchtete embryonale Leberzellen allogenen Ursprungs. Sie wurden von einem sechs Monate alten menschlichen Embryo präpariert. Die histologische Untersuchung dieser Leber zeigte eine normale Morphologie. Nachdem das Organ zerkleinert war, wurde es 30 Minuten lang in 0,25-prozentiger Kollagenaselösung auf einer Schaukelplatte

inkubiert. Ungefähr 5×10^6 isolierte Zellen wurden in eine 100 ml flache Plastikflasche in RPMI-1640-Medium mit 30 % fetalem Kälberserum (FBS), 100 µg/ml Penicillin G und 200 µg/ml Streptomycin ausgesät. Nach 2 bis 4 Tagen wuchs eine ziemlich homogen aussehende Population epithelialer Zellen, die nach Behandlung mit EDTA-Lösung wieder geteilt werden konnte (200 mg/l EDTA in gepufferter Salzlösung mit pH 7,4). Durch Immunopräzipitation mit einem Antihuman-Albumin-serum vom Kaninchen konnte eine geringe Albuminkonzentration im Kulturmedium der Leberzellen nachgewiesen werden.

LYMPHOZYTEN

Die Lymphozyten wurden aus heparinisiertem Venenblut durch Zentrifugation am Ficoll-Hypaque-Gradienten isoliert (1). Die Zellen wurden zweimal mit RPMI-1640-Medium gewaschen; das Medium enthielt 2,5 % Human-Albumin. Die Zellen wurden gezählt und auf 2×10^6 Zellen/ml eingestellt. Die Zellsuspension, die am Ficoll-Hypaque-Gradienten getrennt wurde, enthielt 95 bis 98 % mononukleäre Zellen und 2 bis 5 % Granulozyten. Die T-Zellen wurden mit dem E-Rosetten-Test (13)

bestimmt. Der Normalbereich der T-Zellen betrug $68,4 \pm 7,6$ % der peripheren Blutlymphozyten. Nach Behandlung der durch den Ficoll-Hypaque-Gradienten isolierten Lymphozyten mit Fluorescein-Isothiozyanat-markiertem Anti-Ig-Serum wurden die B-Zellen durch Zählen der gefärbten Zellen bestimmt; der Normalbereich der B-Zellen betrug $12,2 \pm 4,2$ % der peripheren Lymphozyten.

MIKROZYTOTOXIZITÄTSTEST

Der Mikrozytotoxizitätstest wurde nach einer Modifikation von Cohen et al. ausgeführt. Als Targetzellen verwendeten wir allogene embryonale Leberzellen und Changzellen. Die Zellkulturen (1×10^8) wurden mit $50 \mu\text{Ci } ^{125}\text{Joddesoxyuridin}$ (New England Nuclear, Boston, Mass.) bei 37°C 24 Stunden inkubiert. Danach wurde das Medium weggegossen und die Zellen dreimal mit RPMI-1640-Medium gespült. Die Zellen wurden trypsinisiert und gezählt. Die Zellen wurden dann für den Zytotoxizitätstest verwendet, wenn im Gamma-Counter (Nuclear Data, Selectronic System) zwischen 5.000 und 20.000 Zellen gezählt wurden. 20.000 markierte Targetzellen wurden in die Kühlen einer Linbro-Platte Nr. FB 16-24 TC (Linbro Chemical Co. Inc.) verteilt. Nach 3 bis 4 Stunden Inkubation bei 37°C klebten die Targetzellen am Boden der Kühlen. Das Medium in den Platten wurde abgegossen und die Targetzellen in den

Platten mit den unfractionierten Lymphozyten inkubiert. Um Dosis-Wirkungskurven aufstellen zu können, wurden Lymphozyten zu den Targetzellen hinzugefügt in einem Effektor- zu Target-Zellverhältnis (EC/TC) von 10:1 und 100:1. Die Linbro-Platten wurden 24 Stunden in einen begasten Inkubator gestellt; der Überstand wurde abgesaugt und die cpm, die von den markierten Targetzellen in das Medium freigelassen wurden, in einem Gamma-Counter gemessen. In jedem Versuch wurden die Targetzellen mit Lymphozytensuspensionen von zwei Patienten mit Lebererkrankungen, von einem Patienten mit rheumatoider Arthritis und von zwei gesunden Kontrollpersonen in einem EC/TC-Verhältnis von 10:1 und 100:1 inkubiert. Die Beeinträchtigung des Serumfaktors oder des HB_s-Antigens auf die Lymphozytotoxizität wurde in zusätzlichen Experimenten gezeigt. 10 oder 100 μ l frisches autologes Serum oder 10 μ l HB_s-Antigen wurden den zytotoxischen Versuchen hinzugefügt. Als HB_s-Antigen verwendeten wir die handelsübliche Präparation von Ortho-Diagnostics, Frankfurt, ein Gemisch der verschiedenen Subtypen des HB_s-Antigens. Alle cpm-Werte dieser Studie sind Mittelwerte aus Vierfachansätzen, wobei die Standardabweichung von cpm weniger als $\pm 5\%$ betrug.

STATISTIK

Alle vorgestellten Meßergebnisse wurden logarithmisch umgewandelt, weil die ungewandelten Werte die Kriterien der Normalverteilung erfüllen. In Diagrammen sind die cpm-Werte aus den Versuchen mit Lymphozyten von Lebererkrankungen gegen jene der entsprechenden Kontrollversuche aufgezeichnet. Wenn es keinen Unterschied zwischen den cpm-Werten der Lymphozyten in der Experimental- und der Kontrollgruppe gibt, muß man die gleiche Summe der Punkte im Diagramm über und unter der 45° -Achse erwarten. Differenzen zwischen den Gruppen unserer Untersuchung wurden auf Signifikanz mit der Multivarianz-Analyse getestet.

ERGEBNISSE

Die spezifische Lymphozytotoxizität wurde bei unseren Untersuchungen getrennt für jeden Versuchsansatz gezeigt. In Diagrammen wurden die cpm-Werte, die bei den Experimenten mit Lymphozyten von Leberpatienten gewonnen wurden (auf der Y-Achse), gegen die cpm-Werte der Kontrollpersonen des gleichen Versuches (auf der X-Achse) aufgezeichnet. Punkte auf der 45° -Achse in diesen Diagrammen zeigen an, daß die cpm-Werte, die aus

Targetzellen nach Inkubation mit Lymphozyten von Leberpatienten gewonnen wurden, gleich jenen sind, die aus Kontrollexperimenten erhalten wurden, wo Lymphozyten von gesunden Kontrollpersonen verwendet wurden. In diesen Fällen ist also die Lymphozytotoxizität in der Gruppe der Leber-Patienten und in der der Kontrollgruppe identisch. Punkte über der 45° -Achse zeigen, daß die Zytotoxizität der Lymphozyten von Leber-Patienten höher ist als jene der Kontrollpersonen.

Aus Fig. 1 ist ersichtlich, daß die unfraktionierten Lymphozyten von Patienten mit chronisch aktiver Hepatitis zytotoxischer waren gegen die Leber-Targetzellen als die Lymphozyten der normalen Kontrollen. Bei den Fällen der rheumatoiden Arthritis (Fig. 4) wurde die Mehrheit der Punkte auch über die 45° -Achse projiziert. Im Gegensatz dazu waren die Punkte bei den zytotoxischen Experimenten mit Lymphozyten von Patienten mit chronisch persistierender Hepatitis und Hepatitis B gleichmäßig über und unter der 45° -Achse verteilt (Fig. 2 und 3). Statistische Analysen bestätigen die Beurteilung dieser Ergebnisse (Tab. 4). Eine statistisch höhere Zytotoxizität ($p < 0,01$) wurde bei Patienten mit chronisch aktiver Hepatitis als bei Kontrollpersonen errechnet. In allen

anderen Patientengruppen war die Lymphozytotoxizität im Vergleich zu den Kontrollen nicht erhöht. Bei den Patienten mit rheumatoider Arthritis zeigt die statistische Berechnung der Meßwerte eine hohe, aber nicht signifikant erhöhte Lymphozytotoxizität ($p \geq 0,05$).

Changzellen als Targetzellen wurden häufiger durch Lymphozyten von Patienten mit chronisch aktiver Hepatitis und rheumatoider Arthritis als durch Lymphozyten von Kontrollpersonen lysiert; die Unterschiede waren jedoch statistisch nicht signifikant.

Die Ergebnisse der Lymphozytotoxizitätsversuche in Anwesenheit von autologem Serum sind in Fig. 1 bis 4 und Tab. 5 zusammengefaßt. Die Zytotoxizität in den Experimenten mit Lymphozyten von Patienten mit chronisch aktiver Hepatitis und rheumatoider Arthritis wurde durch autologes Serum aufgehoben. Dieser Hemmeffekt konnte bereits mit einer Serumkonzentration von 10 μ l pro Test nachgewiesen werden. Der Hemmeffekt wurde in den Versuchen mit Lymphozyten von Patienten mit Hepatitis B nicht beobachtet. Hier konnte die Lymphozytotoxizität potenziert werden durch Zugabe von HB_s-Antigen-positivem Serum, obwohl die Unterschiede zu den Kontrollen nicht statistisch signifikant waren.

Die Ergebnisse der Lymphozytotoxizitätsexperimente, zu denen HB_s-Antigen hinzugefügt wurde, werden in den Diagrammen (Fig. 1 bis 4) durch Dreiecke angezeigt. Sowohl bei der chronisch aktiven Hepatitis als auch bei der rheumatoiden Arthritis blockierte die Zugabe von HB_s-Antigen die Lymphozytotoxizität. Wir fanden keinen Unterschied zwischen HB_s-Antigen-positiven und HB_s-Antigen-negativen Patienten.

Bei den Experimenten, in denen die Targetzellen mit Lymphozyten von Patienten mit akuter Hepatitis B in Anwesenheit von HB_s-Antigen inkubiert wurden, war die Lymphozytotoxizität signifikant vermehrt im Vergleich zu den Versuchen ohne hinzugefügtes HB_s-Antigen. Die Zunahme der Lymphozytotoxizität wurde bei 5 von 11 Fällen beobachtet. Das Serum dieser Patienten war zum Zeitpunkt der Untersuchung HB_s-Antigen-positiv. Die Zunahme der Lymphozytotoxizität in Gegenwart von HB_s-Antigen wurde sowohl in den Experimenten mit embryonalen Leberzellen als auch mit Chang-Zellen als Targetzellen beobachtet. Die statistische Signifikanz lag bei $p \geq 0,05$.

DISKUSSION

Die bislang vorliegenden Untersuchungsergebnisse weisen darauf hin, daß die Leberschädigung bei der chronischen Hepatitis auf die zelluläre Immunreaktion zurückzuführen ist, die gegen ein Oberflächenantigen der Hepatozyten gerichtet ist (6). Diese Antigene, die durch autoreaktive Zellen bemerkt werden, mögen antigene Determinanten der Leberzelle selbst sein oder sie werden durch Hepatitis B-Virusinfektion induziert. Zellvermittelte Immunreaktionen gegen Leberantigen bei chronisch aktiver Hepatitis und auf HB_s-Antigen bei akuter Hepatitis B sind bereits in vitro in Lymphozytentransformationsversuchen und in Leukozytenmigrationsinhibitionstesten gezeigt worden (12, 14, 24). Es gibt jedoch auch einen Beweis, daß diese zellvermittelten Immunreaktionen direkt an der Erzeugung von Leberzellschädigungen beteiligt sind. Paronetto et al. berichteten über zytotoxische Aktivität von Lymphozyten bei Patienten mit chronisch aktiver Hepatitis gegen autologe Leberzellen. Cochrane et al. zeigten, daß Lymphozyten von Patienten mit chronisch aktiver Hepatitis mit renaler tubulärer Azidose zytotoxisch waren gegen Nierenzellen, die ein spezielles Glukoprotein produzierten.

Die auffallendste Beobachtung unserer Studie ist die häufige zytotoxische Aktivität der Lymphozyten von Patienten mit chronisch aktiver Hepatitis sowohl gegen embryonale Leberzellen als auch gegen Changzellen. Aber auch die Lymphozyten von Patienten mit rheumatoider Arthritis zeigten ein hohes Vorkommen von Lymphozytotoxizität. Die Signifikanz dieser Beobachtung wurde bestimmt, als die Ergebnisse der Zytotoxizitätsteste dieser Patienten verglichen wurden mit der Lymphozytotoxizität bei Patienten mit chronisch persistierender Hepatitis oder Hepatitis B.

Die Spezifität dieser Reaktionen bleibt unklar. Die Ergebnisse zeigen eine vermehrte zytotoxische Wirksamkeit der Lymphozyten von Patienten mit chronisch aktiver Hepatitis im Vergleich zu gesunden Kontrollen. Sie schließen nicht notwendigerweise eine antigenspezifische Lymphozytotoxizität mit ein, besonders da die Lymphozyten von Patienten mit rheumatoider Arthritis ebenfalls eine vermehrte Lymphozytotoxizität zeigten. Es muß diskutiert werden, daß der zytotoxische Effekt der spontanen zellvermittelten Zytotoxizität normaler Lymphozyten gegen eine Vielfalt von Gewebekulturzelllinien entspricht (11).

Es ist nicht wahrscheinlich, daß wir es mit einer T-zellabhängigen Lymphozytotoxizität gegen Histokompatibilitätsantigene der Targetzellen, die verschieden sind von denen der Effektorzellen, zu tun hatten. Sowohl die Hepatitis-Patienten wie auch die Kontrollen wurden zufällig ausgewählt und waren nicht vorsensibilisiert. Eine in vitro-Immunisation der Lymphozyten gegen Histokompatibilitätsantigene während der 24-stündigen Inkubationszeit kann nicht angenommen werden, da wir wissen, daß zytotoxische T-Zellen sich erst nach 5 bis 7tägiger Inkubationszeit entwickeln (2, 20, 23). Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die Ergebnisse keine Spezifität der zytotoxischen Reaktionen zeigen: daraus kann geschlossen werden, daß bei Patienten mit chronisch entzündlichen Erkrankungen wie chronisch aktive Hepatitis oder rheumatoide Arthritis die Häufigkeit zytotoxischer Lymphozyten im peripheren Blut signifikant erhöht ist. Der Effekt kann von der spontanen zellvermittelten Zytotoxizität abhängen.

In unseren Lymphozytotoxizitätsversuchen haben wir mit unfraktionierten Lymphozyten des peripheren Blutes gearbeitet. Die Lymphozyten bestanden im

Durchschnitt aus 60 bis 80 % E-Rosetten bildenden T-Zellen und weniger als 20 % Immunglobulin- oder Fc-Rezeptor tragenden Zellen. Wir fanden keine signifikanten Unterschiede im T- und B-Zellgehalt bei den verschiedenen Gruppen der Lebererkrankungen (22).

Aus unseren Daten konnte nicht differenziert werden, ob die Effektorzellen T- oder B-Zellen waren oder ob die Mitwirkung dieser Zellen mit Makrophagen für den zytotoxischen Effekt verantwortlich waren. Antikörper-abhängige Lymphozytotoxizität spielte keine wichtige Rolle bei diesen Versuchen (8, 17). Von der Technik her, die in unseren Versuchen verwendet wurde, ist es unwahrscheinlich, daß Serumfaktoren in die Induktion der Lymphozytotoxizität einbezogen wurden. Alle Lymphozyten wurden 24 Stunden bei 4°C in serumfreiem Medium vor Zugabe zu den Targetzellen inkubiert. In den Testen, in denen die Lymphozyten mit autologem Serum inkubiert wurden, war die Lymphozytotoxizität signifikant erniedrigt. Die Hemmwirkung des Serums wurde klar bei Patienten mit chronisch aktiver Hepatitis und rheumatoider Arthritis gezeigt. Aber auch normales Serum hat einen hemmenden Einfluß auf die Lymphozytotoxizität, wie in einer Serie von Experimenten mit einem Mischserum von gesunden Personen gezeigt werden konnte. Es ist anzunehmen, daß menschliches Serum einen Hemmfaktor enthält, dessen Natur allerdings unbekannt ist.

Auffallend war die Beobachtung, daß Lymphozyten von Patienten mit akuter Hepatitis B gegen Targetzellen zytotoxisch sind, wenn sie mit HB_s-Antigen inkubiert werden. Dieser Effekt konnte sowohl mit autologem HB_s-Antigen-positivem Serum als auch mit HB_s-Antigen aus anderer Quelle gezeigt werden. Interessant ist, daß Lymphozyten weder von HB_s-Antigen-positiven noch von HB_s-Antigen-negativen Patienten mit chronisch aktiver bzw. chronisch persistierender Hepatitis eine Zunahme der Lymphozytotoxizität zeigen. Es ist bekannt, daß Lymphozyten von Hepatitis-B-Patienten durch HB_s-Antigen in vitro stimuliert werden können (5, 10, 24, 26). Diese Entdeckung kann als Produktion zytotoxischer Lymphozyten während der Inkubation vorsensibilisierter Lymphozyten mit HB_s-Antigen interpretiert werden. Dieser Effekt ist verwandt mit der zytotoxischen Aktivität von Lymphozyten nach Stimulation mit Phythämagglutinin oder spezifischem Antigen (8, 9).

ZUSAMMENFASSUNG

Die Lymphozytotoxizität bei Patienten mit akuter Hepatitis B, chronisch aktiver Hepatitis, chronisch persistierender Hepatitis und rheumatoider Arthritis sowie von gesunden Kontrollpersonen wurde mit Hilfe eines Mikrozytotoxizitätstestes nach Cohen et al. unter Verwendung von ^{125}J oddesoxyuridin-markierten embryonalen Leberzellen untersucht. Unfraktionierte Lymphozyten des peripheren Blutes von Patienten mit chronisch aktiver Hepatitis und rheumatoider Arthritis zeigten häufig eine zytotoxische Aktivität. Die Lymphozytotoxizität war bei der chronisch aktiven Hepatitis signifikant vermehrt im Vergleich zu der bei normalen Kontrollpersonen bei einem Effektor- zu Target-Zellverhältnis von 10:1 bzw. 100:1. Die Spezifität der zytotoxischen Reaktion gegenüber Targetzellen konnte allerdings nicht nachgewiesen werden. Die Zugabe von autologem Serum zu den zytotoxischen Versuchen blockierte die Lymphozytotoxizität bei Patienten mit chronisch aktiver Hepatitis. Ein potenzierender Effekt auf die Lymphozytotoxizität wurde bei Patienten mit Hepatitis B nach Zugabe von autologem Serum beobachtet. Diese Reaktion geht wahrscheinlich auf die Anwesenheit von HB_s -Antigen im Serum zurück, da das Hinzufügen von HB_s -Antigen anderer Herkunft ebenfalls die Zytotoxizität bei Hepatitis B-Patienten im Lymphozytotoxizitätstest erhöhte. Dieser Effekt wurde weder bei HB_s -Antigen-positiven Patienten noch bei HB_s -Antigen-negativen Patienten mit chronisch aktiver oder chronisch persistierender Hepatitis beobachtet.

Tabelle 1

Diagnose	Anzahl	Geschlecht	Alter (Mittelwert und Bereich)
Hepatitis B	11	4/7	36,1 (21 - 66)
Chronisch aktive Hepatitis	14	8/6	46,7 (20 - 74)
Chronisch persistierende Hepatitis	8	3/5	46,3 (21 - 73)
Rheumatoide Arthritis	12	6/6	43,2 (24 - 66)
Kontrollen	32	17/15	38,2 (22 - 65)

Tabelle 2

Diagnose	Anzahl	⁺ HB _s -Antigen- positiv	⁺ *GPT 100 U/25-100 U	+ IgG 1.500 mg%
Hepatitis B	11	11	11/0	0
Chronisch aktive Hepatitis	14	5	3/7	10
Chronisch persistierende Hepatitis	8	4	0/2	1
Rheumatoide Arthritis	12	0	0/1	10
Kontrollen	32	0	0/0	0

* GPT (Glutamat-pyruvat-Transaminase)

+ Anzahl der Fälle

Tabelle 3

Diagnose	*ANA +	**RF +	Lymphozyten in mm ³	T-Zellen/B-Zellen Mittelwert $\pm$ SD
Hepatitis B	0	0	2234	64 $\pm$ 8 / 11 $\pm$ 4
Chronisch aktive Hepatitis	4	3	2142	70 $\pm$ 5 / 12 $\pm$ 5
Chronisch persistierende Hepatitis	0	0	1940	72 $\pm$ 12 / 14 $\pm$ 6
Rheumatoide Arthritis	0	8	2095	66 $\pm$ 7 / 15 $\pm$ 7
Kontrollen	0	0	1857	68 $\pm$ 6 / 12 $\pm$ 4

* ANA (Antimukleäre Antikörper, bestimmt mit der Immunfluoreszenztechnik
unter Verwendung von Rattenleberschnitten)

** RF (Rheumafaktor)

+ Anzahl der Fälle

Tabelle 4

Lymphozytotoxizität gegen embryonale Leber- und Changzellen bei Patienten mit Lebererkrankungen und rheumatoider Arthritis im Vergleich zur Lymphozytotoxizität bei gesunden Kontrollpersonen

Lympozyten von Patienten mit:	Target- zellen	F- Wert	Freiheits- grade	Signi- fikanz
Hepatitis B	Leberzellen	0,49	(2,9)	n. s.
	Changzellen	1,36	(2,9)	n. s.
Chronisch aktiver Hepatitis	Leberzellen	8,66	(2,12)	$p < 0,01$
	Changzellen	3,47	(2,12)	n. s.
Chronisch persis- tierender Hepatitis	Leberzellen	0	(2,6)	n. s.
	Changzellen	0,66	(2,6)	n. s.
Rheumatoider Arthritis	Leberzellen	4,22	(2,9)	$p \geq 0,05$
	Changzellen	3,32	(2,9)	n. s.

Tabelle 5

Lymphozytotoxizität gegen embryonale Leber- und Changzellen in Anwesenheit von autologem Serum bei Patienten mit Lebererkrankungen und rheumatoider Arthritis im Vergleich zur Lymphozytotoxizität bei gesunden Kontrollpersonen

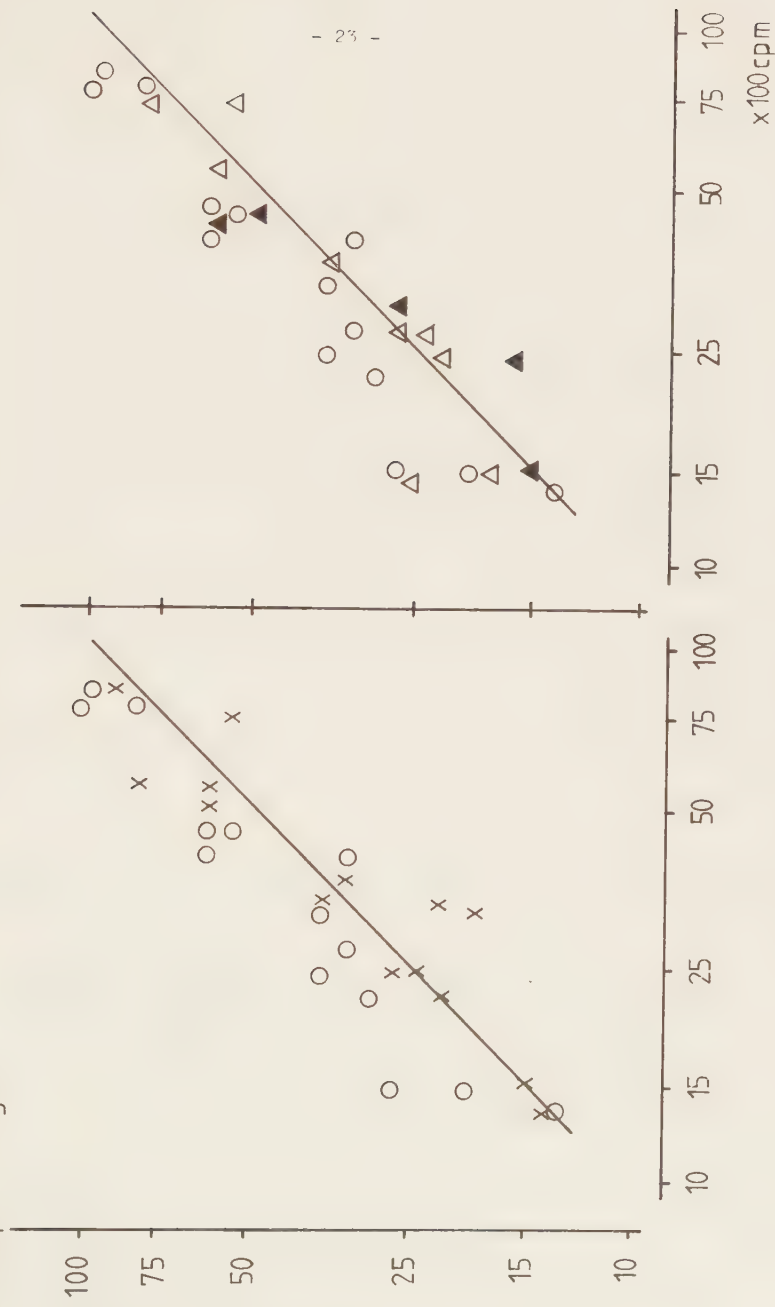
Lymphozyten von Patienten mit	Target- zellen	F- Wert	Freiheits- grade	Signi- fikanz
Hepatitis B	Leberzellen	3,31	(2,9)	n. s.
	Changzellen	2,07	(2,9)	n. s.
Chronisch aktiver Hepatitis	Leberzellen	0,04	(2,12)	n. s.
	Changzellen	0,13	(2,12)	n. s.
Chronisch persis- tierender Hepatitis	Leberzellen	0,06	(2,6)	n. s.
	Changzellen	0,03	(2,6)	n. s.
Rheumatoider Arthritis	Leberzellen	1,11	(2,9)	n. s.
	Changzellen	0,02	(2,9)	n. s.

Tabelle 6

Lymphozytotoxizität gegen embryonale Leber- und Changzellen in Anwesenheit von HB_s-Antigen bei Patienten mit Lebererkrankungen und rheumatoider Arthritis im Vergleich zur Lymphozytotoxizität bei gesunden Kontrollpersonen

Lymphozyten von Patienten mit:	Target- zellen	F- Wert	Freiheits- grade	Signi- fikanz
Hepatitis B	Leberzellen	5,94	(2,9)	0,01<p<0,05
	Changzellen	4,47	(2,9)	0,01<p<0,05
Chronisch aktiver Hepatitis	Leberzellen	0,14	(2,12)	n. s.
	Changzellen	0,29	(2,12)	n. s.
Chronisch peris- tierender Hepatitis	Leberzellen	0,14	(2,6)	n. s.
	Changzellen	0,05	(2,6)	n. s.
Rheumatoider Arthritis	Leberzellen	0,39	(2,9)	n. s.
	Changzellen	0,02	(2,9)	n. s.

Fig. 1



Zu Fig. 1

Zytotoxizität der Lymphozyten von 14 Patienten mit chronisch aktiver Hepatitis gegen Leberzellen. Auf der X-Achse sind die cpm-Werte aufgetragen, die von Targetzellen in Anwesenheit von Lymphozyten gesunder Kontrollpersonen (Mittelwert von drei gesunden Kontrollpersonen) erhalten wurden, gegen die cpm-Werte auf der Y-Achse, die von Targetzellen in Anwesenheit von Lymphozyten von Patienten mit chronisch aktiver Hepatitis im gleichen Versuch erhalten wurden.

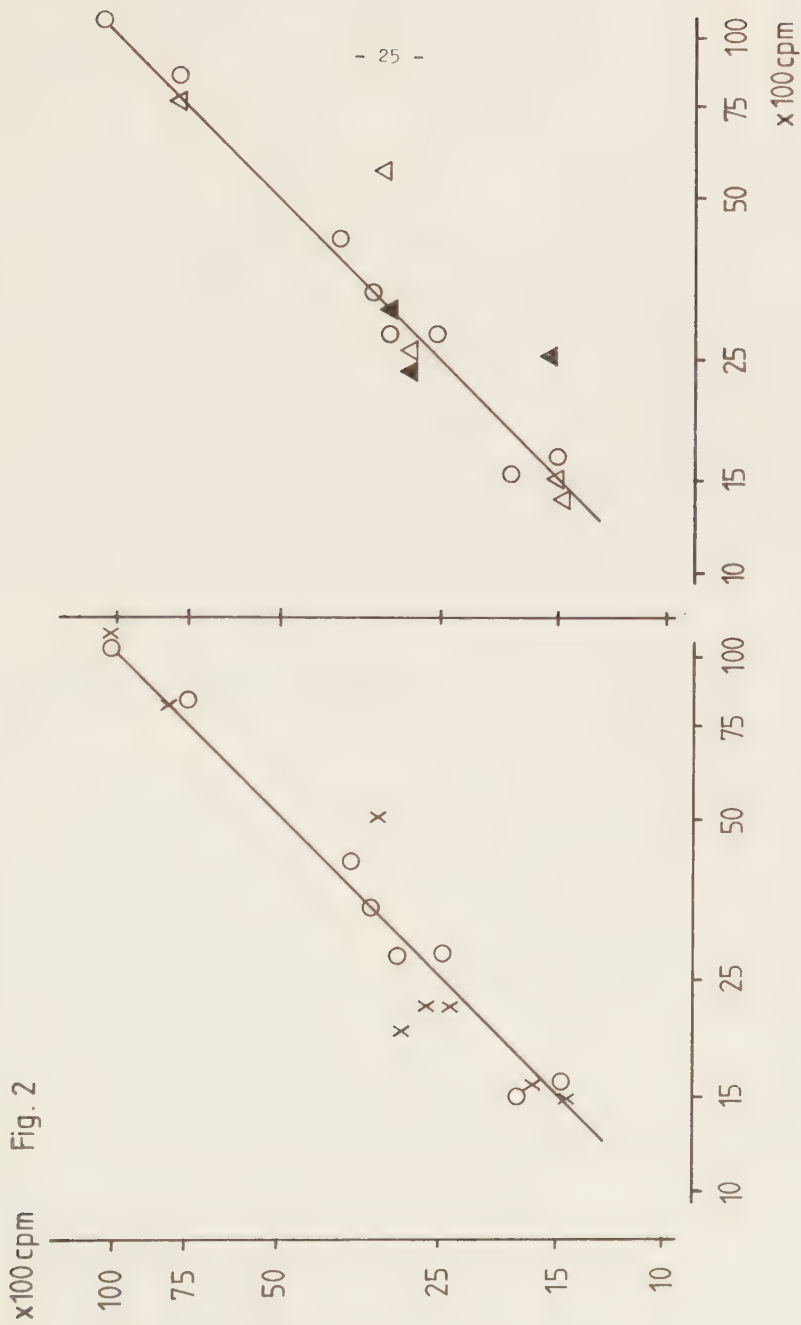
° Lymphozytotoxizität in Abwesenheit von Serum bei einem EC/TC von 100:1

x Lymphozytotoxizität in Anwesenheit von 10 μ l autologem Serum

△ Lymphozytotoxizität in Anwesenheit von 10 μ l HB_s-Antigen

(Die vollen Dreiecke zeigen die Ergebnisse bei HB_s-Antigen-positiven Patienten, die offenen Dreiecke betreffen die HB_s-Antigen-negativen Patienten)

Fig. 2



Zu Fig. 2

Zytotoxizität der Lymphozyten von 8 Patienten mit chronisch persistierender Hepatitis gegen Leberzellen. Auf der X-Achse sind die cpm-Werte aufgetragen, die von Targetzellen in Anwesenheit von Lymphozyten gesunder Kontrollpersonen erhalten wurden, gegen die cpm-Werte auf der Y-Achse, die von Targetzellen in Anwesenheit von Lymphozyten von Patienten mit chronisch persistierender Hepatitis im gleichen Versuch erhalten wurden.

(Die Symbole $\circ$, $\times$ und Δ haben die gleiche Bedeutung wie bei Fig. 1)

Fig. 3

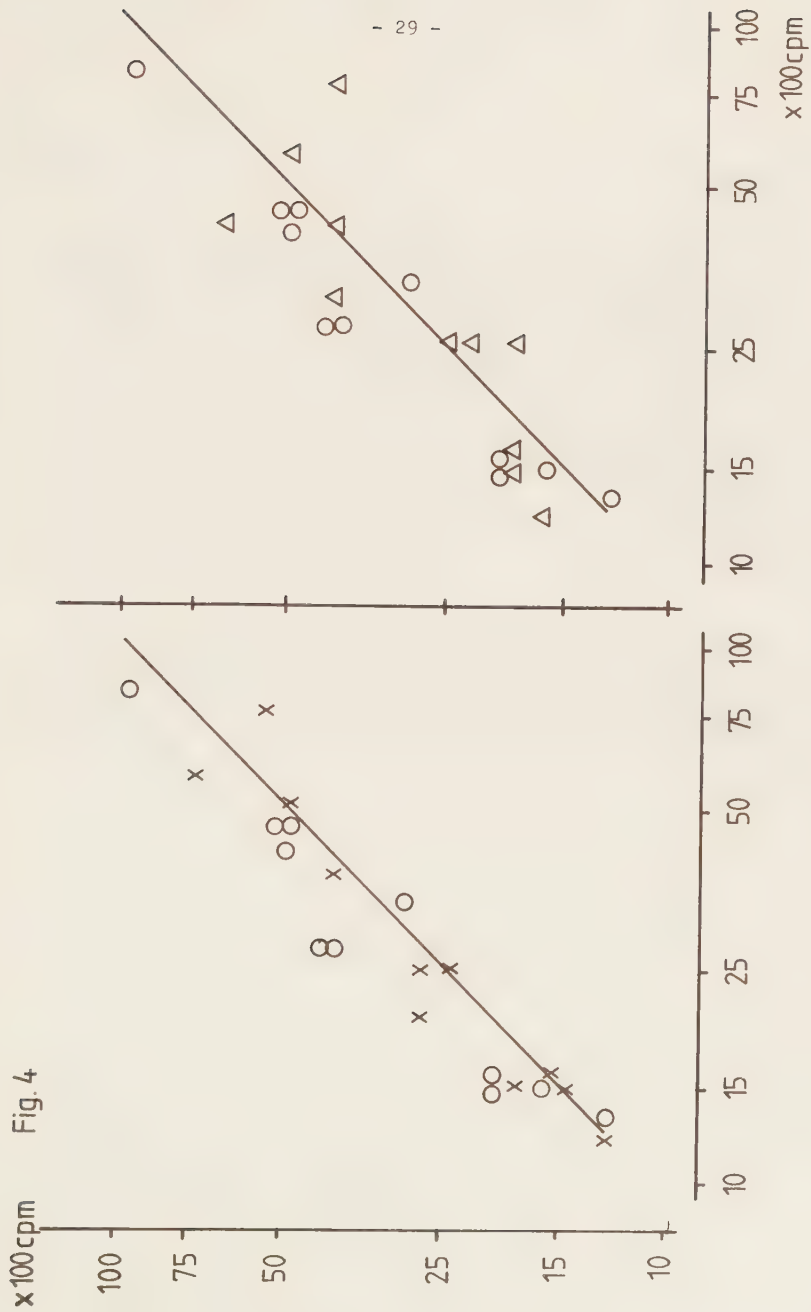


Zu Fig. 3

Zytotoxizität der Lymphozyten von 11 Patienten mit akuter Hepatitis B gegen Leberzellen. Auf der X-Achse sind die cpm-Werte aufgetragen, die von Targetzellen in Anwesenheit von Lymphozyten gesunder Kontrollpersonen erhalten wurden, gegen die cpm-Werte auf der Y-Achse, die von Targetzellen in Anwesenheit von Lymphozyten von Patienten mit akuter Hepatitis B im gleichen Versuch erhalten wurden.

(Die Symbole $^{\circ}$, x und Δ haben die gleiche Bedeutung wie bei Fig. 1)

Fig. 4



Zu Fig. 4

Zytotoxizität der Lymphozyten von 12 Patienten mit rheumatoider Arthritis gegen Leberzellen. Auf der X-Achse sind die cpm-Werte aufgetragen, die von Targetzellen in Anwesenheit von Lymphozyten gesunder Kontrollpersonen erhalten wurden, gegen die cpm-Werte auf der Y-Achse, die von Targetzellen in Anwesenheit von Lymphozyten von Patienten mit rheumatoider Arthritis im gleichen Versuch erhalten wurden.

(Die Symbole $^{\circ}$, x und Δ haben die gleiche Bedeutung wie bei Fig. 1)

LITERATURVERZEICHNIS

1. Boyum A.

Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood

Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl. 21, 97 (1968)

2. Cerottini J.C., Nordin A.A. and Brunner K.T.

Cellular and humoral response to transplantation antigens

J. Exp. Med. 134, 553 (1971)

3. Cochrane A.M.G., Tsantoulou C.C., Moussouros A.,

McFarlane I.G., Eddleston A.L.W.F. and Williams R.

Lymphocyte cytotoxicity for kidney cells in the renal tubular acidosis of autoimmune liver disease

Gut 16, 828 (1975)

4. Cohen A.M., Millar R.C. and Detchem A.S.

A microassay for cytotoxic antibody using ¹²⁵I-iododeoxyuridin labeled target cells

Transplantation 13, 57 (1972)

5. De Gast G.C., Houwen B. and Nieweg H.O.

Specific lymphocyte stimulation by purified heat inactivated hepatitis B antigen

Brit. Med. J. IV, 707 (1973)

6. Dudley F.J., Giustino V. and Sherlock S.
Cell mediated immunity in patients positive for
hepatitis associated antigen
Brit. Med. J. IV, 754 (1972)
7. Eddleston A.L.W.F. and Williams R.
Inadequate antibody response to HBag or suppressor
T-cell defect in development of active chronic
hepatitis
Lancet II, 1543 (1974)
8. Gale D. and McLennan I.C.M.
A method of measuring antibody- and phytohemagglutinin-
induced lymphocyte dependent cytotoxicity using whole
blood
Clin. exp. Immunol. 23, 252 (1976)
9. Holm G., Björkholm M., Mellstedt H. and Johansson B.
Cytotoxic activity of lymphocytes from patients with
Hodgkin's disease
Clin. exp. Immunol. 21, 376 (1975)
10. Ito K., Nakagawa J., Okimoto Y. and Nakano H.
Chronic hepatitis; migration inhibition of leuco-
cytes in the presence of Australia antigen
New Engl. J. Med. 286, 1005 (1972)

11. Jondal M. and Pross H.

Surface markers on human B- and T-lymphocytes.

VI. Cytotoxicity against cell lines as a functional marker for lymphocyte subpopulations

Int. J. Cancer 15, 596 (1975)

12. Knolle J., Meyer zum Büschenfelde K.H., Bolte J.P. und Berger J.

Zelluläre Immunreaktion gegenüber dem Hepatitis-assoziierten Antigen und homologem leberspezifischen Protein bei akuten HBag-positiven Hepatitiden
Klin. Wschr. 51, 1172 (1973)

13. Lay W.H., Mendes N.F., Bianco C. and Nussenzweig V.

Binding of sheep red blood cells to a large population of human lymphocytes

Nature (London) 230, 531 (1971)

14. Miller J., Smith M.G.M., Mitchell C.G., Reed W.D., Eddleston A.L.W.F. and Williams R.

Cell mediated immunity to a human liver specific antigen in patients with active chronic hepatitis and primary biliary cirrhosis

Lancet II, 296 (1972)

15. Newble D.I., Holmes K.T., Wangel A.G. and Forbes I.J.
Immune reactions in acute viral hepatitis
Clin. exp. Immunol. 20, 17 (1975)
16. Paronetto F. and Vernace S.
Immunological studies in patients with chronic active hepatitis. Cytotoxic activity of lymphocytes to autochthonous liver cells grown in tissue culture
Clin. exp. Immunol. 19, 99 (1975)
17. Perlmann P., Perlmann H. and Wigzell H.
Lymphocyte mediated cytotoxicity in vitro. Induction and inhibition by humoral antibody and nature of effector cells
Transpl. Rev. 13, 91 (1972)
18. Reed W.D., Lee W.M., Eddleston A.L.W.F., Mitchell C.G., Zuckerman A.J. and Williams R.
Cell mediated immunity to hepatitis B antigen in antigen negative chronic hepatitis
Gut 15, 341 (1974)
19. Smith M.G.M., Golding P.L., Eddleston A.L.W.F., Mitchell C.G., Kemp A. and Williams R.
Cell mediated immune responses in chronic liver diseases
Brit. Med. J. II, 527 (1974)

20. Sondel P.M., Chess L., McDermott R.P. and Schlossmann S.F.
Immunological functions of isolated human lymphocyte subpopulations. III. Specific allogenic lympholysis mediated by human T-cells alone
J. Immunol. 114, 982 (1975)
21. Thestrup-Perdersen K., Ladefoged K. and Andersen P.
Lymphocyte transformation test with liver specific protein and phytohemagglutinin in patients with liver disease
Clin. exp. Immunol. 24, 1 (1976)
22. Thomas H.C., Freni M., Sanchez-Tapias J., De Villiers D., Jain S. and Sherlock S.
Peripheral blood lymphocyte populations in chronic liver disease
Clin. exp. Immunol. 26, 222 (1976)
23. Wagner H., Röllinghoff M. and Nossal G.J.V.
T-cell mediated immune response induced in vitro. A probe for allograft and tumor immunity
Transplant. Rev. 17, 3 (1973)
24. Warnatz H.
Immune reactions to hepatitis B antigen in acute and chronic hepatitis
Acta hepato-gastroenterol. 21, 237 (1974)

25. Warnatz H., Scheiffarth F. and Schmeissner R.
Studies on the cytotoxic effect of in vivo
and in vitro immunized lymphocytes on liver
target cells
Clin. exp. Immunolog. 21, 250 (1975)
26. Yeung-Laiwah A.A.C., Chaudhuri A.K.R. and Anderson J. R.
Lymphocyte transformation and leucocyte migration
inhibition by Australia antigen
Clin. exp. Immunol. 15, 27 (1973)

Herrn Prof. Dr. F. Scheiffarth möchte ich für die freundliche Überlassung des Themas danken.

Ein besonderes Anliegen ist es mir, Herrn Prof. Dr. H. Warnatz, der mir immer mit Rat und Tat entscheidend zur Seite stand, meinen herzlichsten Dank auszusprechen.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. L. Horbach für die Ratschläge bei den statistischen Darstellungen.

Herzlichen Dank möchte ich auch den Mitarbeitern im immunologischen Labor Frau Leowald, Frau Lutz, Frä. Thiemann, Frä. Rauh und Herrn Rückert für die Unterstützung sagen.

L e b e n s l a u f

Ich, Werner G u t m a n n, wurde am 28. November 1940 in Weißenburg/Bay. als Sohn des Amtrats Erich Gutmann und seiner Ehefrau Else, geb. Lehnberger, geboren.

Von 1947 bis 1952 besuchte ich in Weißenburg die Volksschule, anschließend die Oberrealschule und bestand dort im Juli 1961 das Abitur.

Anschließend war ich als Offizier auf Zeit bei der Bundeswehr.

In Würzburg begann ich mit dem Medizinstudium. 1966 bestand ich das Vorphysikum, dann holte ich das kleine Lateinum nach. 1969 bestand ich ebenfalls in Würzburg das Physikum. Im Dezember 1972 beendete ich mein Studium dort mit dem Staatsexamen.

Vom 1. 2. bis 30. 9. 1973 war ich als Medizinalassistent in der Medizinischen Universitäts-Poliklinik Würzburg, anschließend im Kreiskrankenhaus Ochsenfurt/Main. Seit 1. März 1974 arbeite ich am Institut und Poliklinik für klinische Immunologie der Universität Erlangen-Nürnberg.

Offsetdruck-Fotodruck

J. Hogl, 8520 Erlangen, Hauptstr. 109 (Nähe Martin-Luther-Platz) Tel. 22990